

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

szt. Direktor: Prof. Dr. med. F. Hartmann

**Immunologischer Nachweis der
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
und ihres Antikörpers
mit Hilfe des Latex-Testes**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Axel Wietasch

aus Berlin

Marburg

1966

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 24. Mai 1966
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. O. Braun-Falco
Referent: Prof. Dr. N. Lang
Correferent: Prof. Dr. R. Siebert

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

szt. Direktor: Prof. Dr. med. F. Hartmann

**Immunologischer Nachweis der
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
und ihres Antikörpers
mit Hilfe des Latex-Testes**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Axel Wietasch

aus Berlin

Marburg

1966



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 24. Mai 1966
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. O. Braun-Falco

Referent: Prof. Dr. N. Lang

Correferent: Prof. Dr. R. Siegert

Inhaltsübersicht

A.	Einleitung	
1.	Fragestellung	S. 1
2.	Latex als Versuchsmodell	S. 1
B.	Methodik	
1.	Immunisierung	S. 3
2.	Globulinisolierung und Eiweißbestimmung	S. 3
3.	Verwendete Reagentien	S. 4
4.	Beladung der Latex-Partikel	S. 4
a.	mit Enzym	S. 4
b.	mit γ -Globulin	S. 4
5.	Versuchsanordnungen	S. 4
a.	GOT-Latex + Anti-GOT-Globulin	S. 4
b.	Antikörper-Latex + GOT	S. 5
c.	Antikörper + GOT zu Latex	S. 5
d.	Antikörper + GOT zu GOT-Latex	S. 5
e.	Antikörper-Latex + GOT-Latex	S. 5
6.	Technik der J-131- Markierung der Enzyme und Globuline	S. 5
C.	Ergebnisse	
1.	Agglutinationstest zum Antikörpernachweis	S. 6
2.	Agglutinationstest zum Enzymnachweis	S. 14
3.	Agglutinations-Inhibitionstest zum Enzymnachweis	S. 23
4.	Agglutination zwischen antigenbeladenem Latex und antikörperbeladenem Latex ("Doppel-Latex-Test")	S. 30
D.	Diskussion	S. 32
E.	Zusammenfassung	S. 34
F.	Literatur	S. 35



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554417_0064

A. Einleitung

1. Fragestellung

Die Bedeutung der Transaminasebestimmung in der internistischen Diagnostik und als Screeningtest bei Blutbanken (zur Elimination potentieller Träger des Hepatitisvirus aus der Blutspende) war der Anlaß, nach einer möglichst einfachen Bestimmungsmethode zu suchen. Dabei wurde eher ein semiquantitativer Test zur Abgrenzung von "normal" und "pathologisch" erwartet als ein der photometrischen Enzymbestimmung vergleichbar quantitatives Verfahren. Die von dem Test zu fordernde Spezifität und Empfindlichkeit des Enzymnachweises sowie die Unabhängigkeit von größeren Apparaturen waren am ehesten von einer immunologischen Methode zu erhoffen, nachdem die Antigenspezifität der Transaminasen bekannt (4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13) und eine wesentliche Voraussetzung der Immundiagnostik erfüllt war, nämlich die Existenz eines genügend reinen Antigens in Form der handelsüblichen Transaminasen ⁺) ⁺⁺). Unter den immundiagnostischen Methoden erwies sich die Latexagglutinationsreaktion sowohl zum Enzym- als auch zum Enzymantikörperrnachweis geeignet.

2. Latex als Versuchsmodell

Nach den ersten Erfahrungen von SINGER und PLOTZ (17) und RHEINS und Mitarbeitern (16) haben sich Latexpartikel wegen ihrer Affinität zu γ -Globulin bei immunologischen Nachweismethoden, in diesem Fall auf dem Gebiet der Rheumaserologie, als brauchbar erwiesen. GOLDIN (1), HENRY und LITTLE (2), MILGROM und GOLD-

⁺) Schweineherzenzyme von C.F. Boehringer, Mannheim.

⁺⁺) Abkürzungen: GOT = cytoplasmatische Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase; AK = Antikörperglobulin; KG = Kontrollglobulin

STEIN (14) und PHILP (15) haben gezeigt, daß sich Latex auch bei anderen Antigen-Antikörperreaktionen als Indikator verwenden läßt. Auf Grund der Versuchsergebnisse dieser Autoren lag die Erwartung nahe, die Latexagglutinationsreaktion auch zum Nachweis der Transaminasen benutzen zu können.

B. Methodik

1. Immunisierung

Kaninchen wurden mit hochgereinigter GOT und GPT aus Schweineherzcytoplasma (C.F.Boehringer, Mannheim) immunisiert. Es wurde innerhalb von 10 Tagen dreimal und nach weiteren 2 Wochen einmal ein Gemisch aus jeweils 0,2 mg Enzymprotein und 0,4 ml 1% Aluminiumhydroxydgel unter Penicillinzusatz intraperitoneal injiziert. Die Antiseren wurden eine Woche nach Abschluß der Immunisierung gewonnen. Sie wurden einzeln auf ihre aktivitätshemmende Eigenschaft untersucht und mit den nach einer Auffrischimpfung drei Monate später gewonnenen Antiseren gemischt. Bei allen Tieren war bereits vor Beginn der Immunisierung Blut abgenommen worden; das daraus gewonnene Misch-Kontrollserum wurde tiefgekühlt aufbewahrt. Die enzymaktivitätshemmende Wirkung der einzelnen Antiseren lag zwischen 80 und 95% mit einem Durchschnitt bei 90% und wurde elektrophotometrisch bestimmt (dazu auch 6 und 12).

2. Globulinisolierung und Eiweißbestimmung

Zu dem durch Zentrifugieren des Blutes gewonnenen Serum wurde tropfenweise in 10 Minuten eine heiße gesättigte Ammonsulfatlösung zugesetzt und zwar im Verhältnis 2 Teile... : 3 Teilen.... Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37° und 12 Stunden bei 4° wurde das Gemisch bei 4000 Upm zentrifugiert und das Sediment dreimal mit je 5-10 ml einer 43%igen Ammonsulfatlösung gewaschen. Die Kaninchenglobuline (überwiegend γ -Globuline) wurden dann 24 - 48 Stunden gegen einen Phosphatpuffer vom pH 7,2 - 7,4 dialysiert. Vorher war das Sediment in drei Teilen dieses Puffers aufgelöst worden. Nach der Dialyse wurden Proben abgenommen, um den Eiweißgehalt der Lösungen zu bestimmen. Die Eiweißbestimmungen wurden nach zwei colorimetrischen Methoden, nach der Biuretmethode und durch

Bestimmung der Amidoschwarzanfärbung auf Elektrophoresestreifen, durchgeführt.

3. Verwendete Reagentien

- a. Bacto-Latex 0,81 (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) (Polystyren)
- b. GOT und GPT aus Schweineherzcytoplasma (C.F. Boehringer, Mannh.)
- c. Glykokoll-Kochsalz-Puffer (nach Sörensen):
7,505 g Glykokoll
5,85 g Kochsalz
1000 g Aqua dest.
mit 0,1 n NaOH eingestellt auf pH 8,2
- d. Verschiedene Humanseren aus dem Patientengut der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg mit normalen und erhöhten GOT-Aktivitäten.

4. Beladung der Latex-Partikel

- a. mit Enzym (GOT bzw. GPT)

Zu 0,1 ml Latex in 10 ml Glykokoll-Kochsalz-Puffer wurden 0,5 ml Enzym (mit dem gleichen Puffer auf 1:50 verdünnt, d.h. 3600 mU bei GOT und mU bei GPT) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 20 Grad und Abzentrifugation bei 4000 Upm wurde das Sediment einmal mit 10 ml Puffer gewaschen und dann in 10 ml Puffer suspendiert. Die Suspension wurde im Kühlschrank bei 2 - 6 Grad aufbewahrt.

- b. mit γ -Globulin

Zu 0,1 ml Latex in 10 ml Glykokoll-Kochsalz-Puffer wurde 1 ml γ -Globulin (etwa 3%ig) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 20 Grad und 12 Stunden bei 4 Grad sowie Abzentrifugieren bei 4000 Upm (entsprechend ca. 800 g) wurde das Sediment einmal mit 10 ml Puffer gewaschen und dann in der gleichen Menge suspendiert. Die Suspension wurde im Kühlschrank bei 2 - 6 Grad aufbewahrt.

5. Versuchsanordnungen

- a. GOT-Latex + Anti-GOT-Globulin

Dieses Gemisch wurde 90 min. im Wasserbad bei 56 Grad und danach 12 Stunden bei 2 - 6 Grad im Kühlschrank inkubiert. Nach Zentrifugation über 10 min. bei 4 - 5000 Upm wurde das Sediment aufgeschüttelt und der Grad der Ausflockung nach + bis ++++ bewertet. Bei homogener Trübung schrieben wir 0, in Zweifelsfällen (+). Es wurde eine Verdünnungsreihe des γ -Globulins angesetzt, beginnend bei 0,25 ml (etwa 3%ig) bis 0,03 ml (in 2 ml Gesamtflüssigkeit) sowie

ein Kontrollröhrchen ohne Enzymgehalt. Es liefen jeweils zwei gleiche Versuche parallel.

In den ersten Versuchen und in denen zum Spezifitätsnachweis wurde außerdem mit GPT-Latex und Anti-GPT-Globulin gearbeitet.

b. Antikörper-Latex + GOT

Gleiche Behandlung wie in a. Es wurde eine GOT-Verdünnungsreihe angesetzt, beginnend bei 1800 mU bis zu 18 mU. Als Kontrolle wurde ein Kontrollglobulin-Latex mit verschiedenen GOT-Aktivitäten inkubiert.

c. Antikörper + GOT zu Latex

Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde 1 Stunde bei 37 Grad vorinkubiert. Danach wurde die Latex-Suspension hinzugegeben. Die weitere Behandlung geschah wie oben beschrieben.

d. Antikörper + GOT zu GOT-Latex

Gleiche Behandlung wie in c. Nach Vorinkubation wurde der Gesamtkomplex 30 min. bei 20 Grad inkubiert und danach 3 min. bei 2300 Upm abzentrifugiert. Die Bewertung geschah nach dem Grad der Trübung bzw. der Klarheit des Überstandes.
(+++ = klar, 0 = vollkommen trübe)

e. Antikörper-Latex + GOT-Latex

Hierbei wurden die reagierenden Partner in Vertiefungen von Kunststoffplatten gegeben und 30 min. lang geschüttelt. Danach wurde die Ausflockung wie oben bewertet.

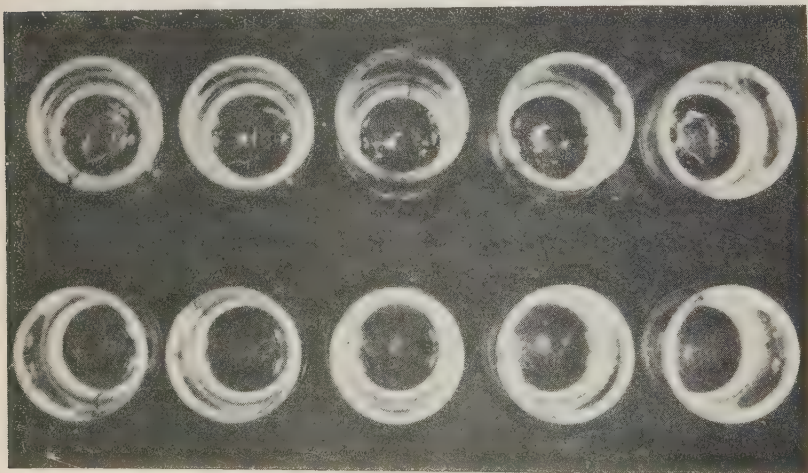
6. Technik der J^{131} -Markierung der Enzyme und Globuline

Die Eiweißlösungen wurden nach WORMALL, FRANCIS und MULLIGAN (18) mit einem definierten Gemisch aus trägerfreier NaJ^{131} -Lösung und Jod-Jodkalilösung versetzt. Vor und nach der Dialyse der jodierten Eiweißlösungen in Phosphatpuffer vom pH 7,2 - 7,4 zwecks Entfernung des ungebundenen Radiojods, wurde durch Radioaktivitätsmessung das Verhältnis von proteingebundenem zu nichtgebundenem Radiojod ermittelt und der Jodierungsgrad berechnet. In den entsprechenden Versuchen lag der Jodierungsgrad zwischen 1 - 5 Atomen Jod/Molekül Eiweiß (Molekulargewicht des γ -Globulins etwa 165 000).

C. Ergebnisse

1. Agglutinationstest zum Antikörpernachweis

Wir untersuchten zunächst die Bindung von GOT- und GPT-Antikörpern durch den mit GOT und GPT beladenen Latex (Versuche der Abbildungen 1a und 1b; Inkubationsbedingungen s. dort).



aktion zwischen GOT-Antikörper und mit GOT beladenem Latex (im folgenden als GOT-Latex bezeichnet), in der unteren Reihe die Reaktion zwischen Kontrollglobulin und GOT-Latex.

Ansatz (von links nach rechts):

1. 0,5 ml AK + 1 ml GOT-Latex
2. 0,4 ml AK + 1 ml GOT-Latex
3. 0,3 ml AK + 1 ml GOT-Latex
4. 0,2 ml AK + 1 ml GOT-Latex
5. 0,1 ml AK + 1 ml GOT-Latex
1. 0,5 ml KG + 1 ml GOT-Latex
2. 0,4 ml KG + 1 ml GOT-Latex
3. 0,3 ml KG + 1 ml GOT-Latex
4. 0,2 ml KG + 1 ml GOT-Latex
5. 0,1 ml KG + 1 ml GOT-Latex

Inkubation 90 min. bei 56 Grad, Kühlung über Nacht bei 6 - 8 Grad, Zentrifugation 10 min. bei 5000 Upm

Somit wird die bekannte Spezifität der GOT-Antikörper auch im Latextest nachgewiesen. Außerdem werden unspezifische Eiweißbindungen sichtbar gemacht, wie die beiden ersten Röhrchen der Ansätze B und C beweisen. Der Enzymgehalt der Latexsuspension betrug 3600 mU GOT pro 0,5 ml.

Versuch II

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von GOT-Latex und Zugabe einer bestimmten, gleich bleibenden Menge der beiden Antikörperglobuline sowie eines Kontrollglobulins.

1.1.1.2.

A.	1.	0,02	ml GOT (144 mU)	in 1 ml Latexsusp. + 0,25 ml	
	2.	0,01	ml GOT (72 mU)		Anti-GOT-Globulin
	3.	0,005	ml GOT (36 mU)		
	4.	0,0025	ml GOT (18 mU)		
	5.	0,0012	ml GOT (9 mU)		
	6.	0,0006	ml GOT (4 mU)		
	7.	0,0003	ml GOT (2 mU)		
	8.	0,0001	ml GOT (1 mU)		
	9.	-----			0,25 ml Anti-GOT-Globulin

B. Gleicher Ansatz, jeweils + 0,25 ml Anti-GPT-Globulin

C. Gleicher Ansatz, jeweils + 0,25 ml Kontrollglobulin

Inkubation 90 min. bei 56 Grad, Kühlung über Nacht bei 6 - 8 Grad, Zentrifugation 10 min. bei 5000 Upm.

Ergebnis:

A.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	++	++	+	+	(+)	∅	∅	∅	∅
	++	++	+++	+	(+)	∅	∅	∅	∅
B.	+	(+)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
		(+)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
		+	(+)	∅	∅	∅	∅	∅	∅
		+	(+)	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Das Ergebnis zeigt einen Unterschied zwischen dem Ansatz A auf der einen und den Ansätzen B und C auf der anderen Seite bis zum Röhrchen drei (= 36 mU GOT). Es wurde das reine Enzym verwendet.

Der positive Ausfall der Reaktion in den beiden ersten Röhrchen der Ansätze B und C beruht auf Nebenreaktionen der GOT mit dem nicht vollständig reinen γ -Globulin.

Versuch III

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von γ -Globulin (Anti-GOT und Anti-GPT) und Zugabe einer bestimmten, gleich bleibenden Menge von GPT-Latex.

Ansatz:

A.	1.	0,25	ml γ -Globulin (Anti-GPT) + 0,01 ml GPT (72 mU) in 1 ml Latexsuspension	
	2.	0,125	ml	
	3.	0,065	ml	
	4.	0,0325	ml	
	5.	0,25	ml	
				↓

B.	1.	0,25	ml γ -Globulin (Anti-GOT) + 0,01 ml GPT (72 mU) in 1 ml Latexsuspension	
	2.	0,125	ml	
	3.	0,065	ml	
	4.	0,0325	ml	
	5.	0,25	ml	
				↓

Inkubation 90 min. bei 56 Grad, Kühlung über Nacht bei 6 - 8 Grad, Zentrifugation 10 min. bei 5000 Upm.

Ergebnis:

A.	1	2	3	4	5
	+++	+	(+)	Ø	Ø
	++	+	(+)	Ø	Ø
B.	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø

Die Auswertung der Versuche I bis III zeigt: GOT-Latex wird nur durch GOT-Antikörper agglutiniert, GPT-Latex nur durch GPT-Antikörper, nicht umgekehrt. Wie in der Immunhemmung der Enzyme findet sich auch in der Latexagglutination keine Kreuzreaktion zwischen GOT und GPT und keine Kreuzreaktion zwischen den Isozymen der GOT. Wie in Immunhemmung und -präzipitation ist auch in der Latexagglutination keine Organ- und keine strenge Spezifität erkennbar; vielmehr besteht eine weitgehende Antigenidentität unter den Schweine- und den Humantransaminasen verschiedener Organe (innerhalb

eines Isozyms), weshalb sich Antikörper gegen die handelsüblichen Schweineherzenzyme für humanpathologische Fragestellungen (s.a. 4, 13) verwenden lassen.

Die kurvenmäßige Darstellung der Enzym-latex-Agglutination durch verschiedene Antikörperglobuline in Abb. 1b zeigt die Eignung der Technik zum semiquantitativen Antikörpernachweis. Es finden sich reproduzierbare gröbere Unterschiede zwischen verschiedenen Antikörperglobulinen (s. die beiden GPT-Antikörper); neben Unterschieden des Schwellenwertes der Agglutination bestehen auch (bei weiterer Erhöhung des Antikörperangebots erkennbare) Unterschiede in der Art des Kurvenverlaufs.

Die Inkubation von GOT-Antisera statt Antikörperglobulinen bewirkte bei sonst vergleichbaren Inkubationsbedingungen eine Agglutination von 1 ml GOT-Latex bereits durch 0,1 ml Antiserum, keine (unspezifische) dagegen selbst durch 0,5 ml Kontrollserum. In Versuchen mit einem Verhältnis von 0,5 ml Antiserum : 0,5 ml Latex zeigte sich jedoch bei den Kontrollen eine unspezifische Flockung (Komplementinaktivierung bei der Inkubation).

Versuch IV

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe radioaktiv beladener GOT und Zugabe einer bestimmten, gleich bleibenden Menge von Antikörperglobulin-Latex (Anti-GOT) bzw. Kontrollglobulin-Latex.

Ansatz:

- | | | | | |
|----|--------------------------|-------|-----------|-----------------------------|
| 1. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:5 | (3000 mU) | + 1 ml Anti-GOT-Glo-Lat. |
| 2. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:10 | (1500 mU) | (=0,1 ml Antikörp.) |
| 3. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:20 | (750 mU) | |
| 4. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:50 | (300 mU) | |
| 5. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:100 | (150 mU) | |
| 6. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:500 | (30 mU) | |
| 7. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:50 | (300 mU) | + 1 ml KG-Lat. (=0,1 ml KG) |
| 8. | 0,05 ml GOT ⁺ | 1:50 | (300 mU) | + 1 ml Latex |

Inkubation 90 min. bei 56 Grad, Kühlung über Nacht bei 6 - 8 Grad, Zentrifugation und dreimaliges Waschen (in Phosphatpuffer) jeweils 10 min. bei 5000 Upm.

Ergebnis:

Aktivitäten des Sedimentes:

1	2	3	4	5	6	7 ₁	7 ₂	7 ₃	8
---	---	---	---	---	---	----------------	----------------	----------------	---

141	62	60	58	47	19	32	30	40	14	Impulse/
130	58	54	48	36	12	14	20	21	8	min.

Gesamtaktivitäten:

1	2	3	4	5	6	7 ₁	7 ₂	7 ₃	8	
273	175	163	155	124	75	103	98	163	93	Impulse/
364	261	152	116	110	62	117	85	176	89	min.

GOT⁺ = mit J¹³¹ markierte GOT

Die Auswertung dieses Versuches zeigt eine messbare Mehrbindung der GOT an Antikörperlatex gegenüber der unspezifischen Bindung an Kontrollglobulinlatex. Eine graphische Darstellung zeigt Abb. 2.

In weiteren radioaktiven Versuchen wurde die prozentuale Bindung der Eiweißkörper (Enzym und Globulin) an Latexpartikel untersucht. Dabei fand sich eine Bindung des Antikörpers an Latex von 1,15% gegenüber der des Enzyms von 32,8% (Mittelwerte aus vier Versuchen).

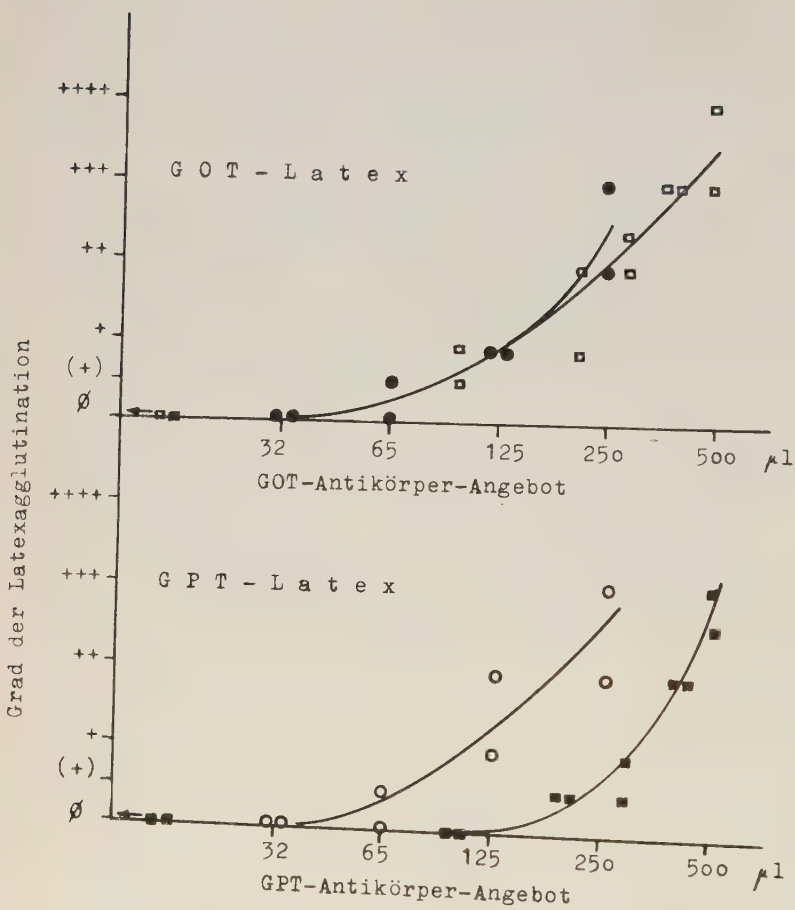


Abb. 1b Zusammenfassung verschiedenzeitiger Versuche.

J^{131} -GOT-Bindung

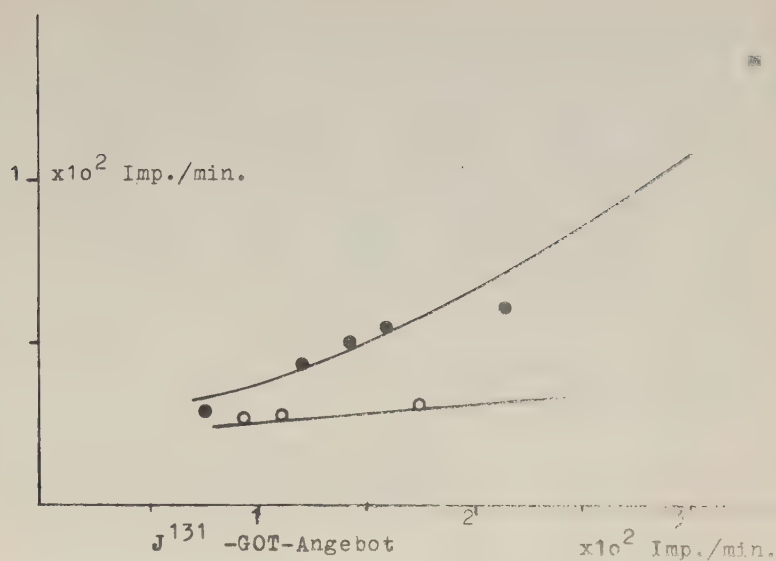


Abb. 2. Bindung von markierter GOT an Antikörper-Latex (●) und Kontrollglobulin-Latex (○).

2. Agglutinationstest zum Enzymnachweis.

Um den Enzymnachweis in der Latexagglutination unabhängig von Serum-Faktoren studieren zu können, inkubierten wir das gereinigte Enzym (Schweineherz-Cytoplasma-GOT) in aufsteigender Dosis mit antikörperbeladenem Latex. Abb. 3 zeigt die Agglutinationskurven bei zwei Verfahrensweisen:

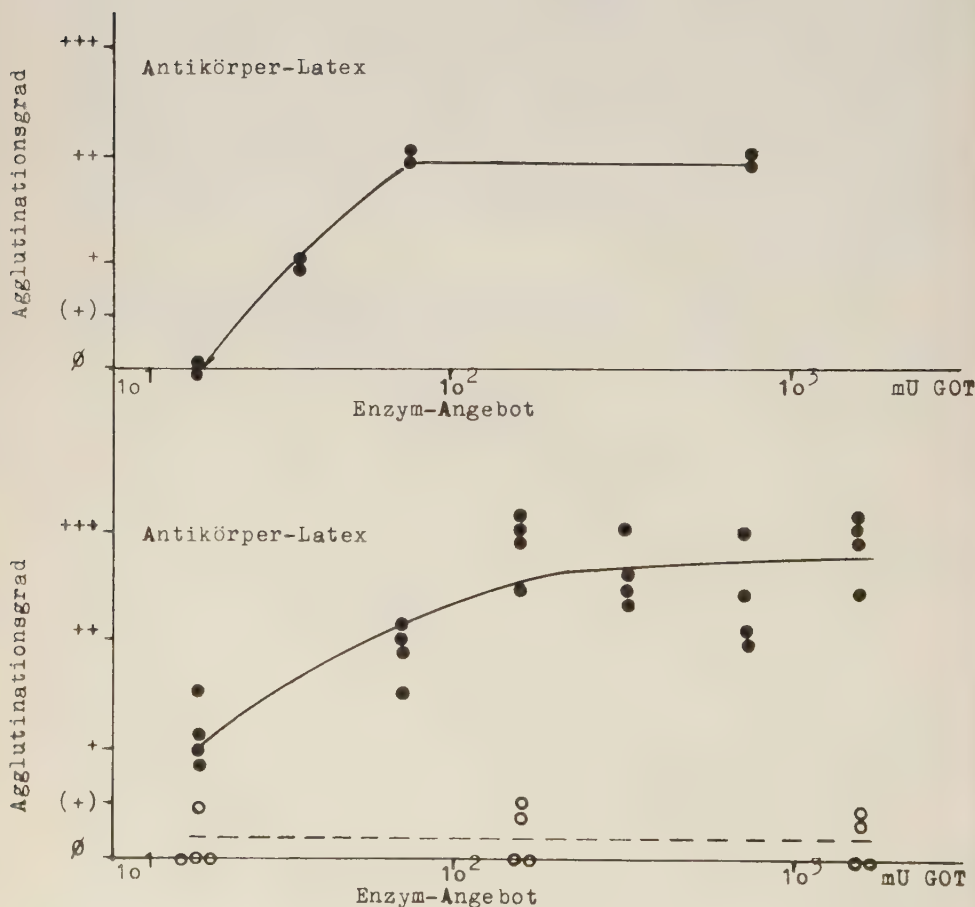


Abb. 3 Erläuterung s. Text. ● = Antikörperlatex
○ = Kontrollglobulinlatex

- a. In den Versuchen der unteren Teilabbildung wurde die durch längere Inkubation bei 56 Grad und 6 - 8 Grad erzielte Agglutination durch nachfolgendes "scharfes" Anzentrifugieren bei 5000 Upm vervollständigt. In der Aufsicht auf die zentrifugierten Proben erscheint das Sediment bei Nicht-Agglutination großflächig und mit "ausgefranstem" Rand und löst sich beim Wiederaufschütteln rauchartig auf. Bei Agglutination ist das Sediment glattrandig und mit ansteigendem Agglutinationsgrad zunehmend kompakt und kleinflächig; es wird beim Aufschütteln je nach Agglutinationsgrad in feineren bis gröberen Flocken bis Fäden und Klumpen sichtbar (s. dazu Versuch V).
- b. In den Versuchen der oberen Teilabbildung zu Abb. 3 wurde eine ebenfalls vom Enzymangebot anhängige Agglutination erzielt, jedoch in wesentlich kürzerer Inkubationszeit und ohne Abzentrifugieren, da die Inkubation unter kontinuierlicher, heftiger Vibration auf einer (bei der Bestimmung des Rheumafaktors erprobten) Schüttel­einrichtung erfolgte. Bei Schüttelinkubation von 3 ml AK-Latex mit 1 ml Enzym­lösung in Glasschälchen war der Agglutinationsgrad eindeutiger und reproduzierbarer abzulesen als bei Schüttelinkubation von nur 0,5 ml AK-Latex mit 0,05 ml Enzym­lösung in kleinen muldenförmigen Vertiefungen einer Plastikplatte. Mit KG-Latex fand sich bei Schüttelinkubation keine Agglutination (s. dazu Versuche VI und VII).

Versuch V

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von GOT und Zugabe einer bestimmten, gleich bleibenden Menge von AK-Latex bzw. KG-Latex.

Ansatz:

1.	0,05 ml GOT 1:5	(1800 mU)	zu 0,5 ml AK-Latex
2.	0,05 ml GOT 1:10	(900 mU)	
3.	0,05 ml GOT 1:20	(450 mU)	
4.	0,05 ml GOT 1:50	(180 mU)	
5.	0,05 ml GOT 1:100	(90 mU)	
6.	0,05 ml GOT 1:500	(18 mU)	
7.	0,05 ml GOT 1:5	(1800 mU)	zu 0,5 ml KG-Latex

Ergebnis:

a. in Aufsicht:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									
									

b. nach Aufschütteln des Sedimentes:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
+++	++	+++	+++	+++	+	(+)	(+)	(+)	Ø
+++	+++	+++	+++	++	+	Ø	Ø	Ø	Ø

Versuch VI

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von GOT und Zugabe von AK-Latex; das Verhältnis beträgt 1:3.

Dieser Versuch ist eine Modifikation der im Abschnitt Methodik unter 5b angegebenen Versuchsanordnungen.

Dabei werden die Reaktionspartner in plane Glasschalen gegeben. Die Inkubation erfolgt unter Schütteln (30-60 min.) bei Zimmertemperatur.

Ansatz:

1. 1 ml GOT 1:50	(7200 mU)	+ 3 ml AK-Latex
2. 1 ml GOT 1:500	(720 mU)	
3. 1 ml GOT 1:5000	(72 mU)	
4. 1 ml GOT 1:10000	(36 mU)	
5. 1 ml GOT 1:20000	(18 mU)	
6. 1 ml Pufferlsg.		

Inkubation 30 min. bei 20 Grad unter Schütteln.

Bewertung in üblicher Weise (Methodik 5a).

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6
++	++	++	+	Ø	Ø
++	++	++	+	Ø	Ø

Bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich eine Nachweisgrenze für GOT bei 36 mU.

Versuch VII

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von GOT (Ansätze A bis D) und von GOT-haltigem Serum (Ansätze E bis H), Zugabe von gleicher Menge AK-Latex bzw. KG-Latex.

In einer weiteren Modifikation zur Methodik Absatz 5b wurde hierbei die Inkubation in muldenförmigen Vertiefungen einer Plastikplatte vorgenommen; es wurde 30 min. bei Zimmertemperatur geschüttelt.

Ansatz:

- A. 1. 0,05 ml GOT 1:5 (3600 mU) + 0,5 ml AK-Latex
 2. 0,05 ml GOT 1:10 (1800 mU)
 3. 0,05 ml GOT 1:20 (900 mU)
 4. 0,05 ml GOT 1:50 (360 mU)
 5. 0,05 ml GOT 1:100 (180 mU)
 6. 0,05 ml GOT 1:500 (36 mU)



B. Parallelversuch

C. Verdünnungsreihe wie A + 0,5 ml KG-Latex

D. Parallelversuch

- E. 1. 0,1 ml Serum (33 mU GOT) + 0,5ml AK-Latex
 2. 0,1 ml Serum (23 mU GOT)
 3. 0,1 ml Serum (16 mU GOT) mit
 4. 0,1 ml Serum (10 mU GOT) Puffer
 5. 0,1 ml Serum (3 mU GOT) verdünnt
 6. 0,1 ml Serum (1 mU GOT)



F. Parallelversuch

G. Verdünnungsreihe wie E mit Normalserum (Ausgangsgelalt 10 mU/ml)

H. Parallelversuch

Inkubation 30 min bei 20 Grad unter Schütteln.

Bewertung in üblicher Weise (s. Versuch VI).

Ergebnis:

	1	2	3	4	5	6
A.	+...++	+...++	+...++	+...++	+...++	+...++
B.	+...++	+...++	+...++	+...++	+...++	+...++
C.	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)
D.	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)
E.	++	+-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)
F.	++	+-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)	Ø-(+)
G.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
H.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Versuch VIII

Prinzip: Seren mit verschiedenem GOT-Gehalt werden im Verhältnis 1 : 3 mit AK-Latex inkubiert (Methodik 5b und Versuch VI).

Ansatz:

- | | | |
|----|-------------------------|----------------------|
| 1. | 1 ml Serum (300 mU GOT) | + 3 ml AK-Latex
↓ |
| 2. | 1 ml Serum (100 mU GOT) | |
| 3. | 1 ml Serum (50 mU GOT) | |
| 4. | 1 ml Serum (30 mU GOT) | |
| 5. | 1 ml Serum (20 mU GOT) | |
| 6. | 1 ml Serum (10 mU GOT) | |

Inkubation 60 min bei 20 Grad unter Schütteln.

Bewertung in üblicher Weise (Methodik 5a).

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6
+++	++	+	Ø	Ø	Ø
+++	++	+	Ø	Ø	Ø

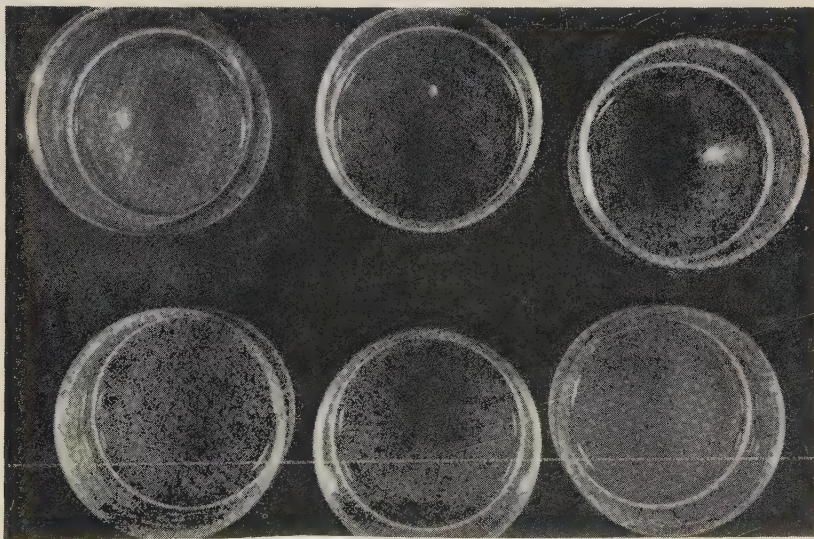


Abb. 4b. Dargestellt sind die sechs Glasschalen entsp. Versuch VIII. trotz nicht optimaler Aufnahmetechnik sind die Unterschiede in der Agglutination erkennbar (Fotografiert im Auflicht gegen dunklen Untergrund). Der Versuch entspricht der Kurve •—• in Abb. 4a.

Versuch IX

Prinzip: Seren mit verschiedenem GOT-Gehalt werden im Verhältnis 2 : 3 mit AK-Latex inkubiert (Methodik 5b und Versuche VI und VIII).

Ansatz:

- | | | | |
|---|------------|-----------------|------------------------|
| 1. | 2 ml Serum | (135 mU GOT/ml) | } + 3 ml AK-Latex
↓ |
| 2. | 2 ml Serum | (72 mU GOT/ml) | |
| 3. | 2 ml Serum | (50 mU GOT/ml) | |
| 4. | 2 ml Serum | (42 mU GOT/ml) | |
| 5. | 2 ml Serum | (38 mU GOT/ml) | |
| 6. | 2 ml Serum | (30 mU GOT/ml) | |
| 7. | 2 ml Serum | (26 mU GOT/ml) | |
| 8. | 2 ml Serum | (17 mU GOT/ml) | |
| 9. | 2 ml Serum | (13 mU GOT/ml) | |
| 10. | 2 ml Serum | (8 mU GOT/ml) | |
| 11.-20. gleiche Seren wie 1.-10. nur statt AK-Latex | | | KG-Latex |

Inkubation 60 min bei 20 Grad unter Schütteln.

Bewertung in üblicher Weise (Methodik 5a).

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
+++	++	++	++	++	+	+	Ø	Ø	Ø
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Wegen der begrenzten Menge des Serums wurden Versuche mit diesem Serum-Latex-Verhältnis ohne Parallelversuche durchgeführt. In mehreren gleichartigen Versuchen war jedoch immer ein gleiches Ergebnis sichtbar. Aus diesem Grunde wurde hier der Versuch IX gewissermaßen als Modell dargestellt.

Durch die Verschiebung des Serum-Latex-Verhältnisses ergab sich eine Empfindlichkeitssteigerung von ~36 mU auf ~26 mU GOT (Kurve o—o in Abb. 4 a).

Versuch X

Prinzip: Es werden zwei Gruppen von Seren angesetzt; die erste mit GOT-Aktivitäten zwischen 25 und 30 mU/ml, die zweite mit GOT-Aktivitäten zwischen 13 und 17 mU/ml. Es wird, entsprechend der Anordnung in Versuch IX, ein Serum-Latex-Verhältnis von 2 : 3 gewählt.

Die Seren stammen von Patienten der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/Lahn. Die GOT-Aktivitäten waren photometrisch bestimmt worden.

Die Methodik entspricht der in Versuch IX angewendeten.

Ansatz:				Auswertung:
1. Pat. E.v.M.	vom	28.7.65	25 mU/ml	+---+
2. Pat. K.F.	vom	20.7.65	25 mU/ml	++
3. Pat. A.P.	vom	20.7.65	25 mU/ml	++
4. Pat. M.K.	vom	19.7.65	25 mU/ml	++
5. Pat. K.F.	vom	19.7.65	25 mU/ml	+
6. Pat. H.N.	vom	2.8.65	27 mU/ml	++
7. Pat. A.S.	vom	26.7.65	27 mU/ml	+
8. Pat. K.P.	vom	19.7.65	28 mU/ml	+
9. Pat. W.S.	vom	3.8.65	29 mU/ml	++
10. Pat. K.L.	vom	20.7.65	30 mU/ml	+++
1'. Pat. A.K.	vom	2.8.65	13 mU/ml	(+)
2'. Pat. B.S.	vom	2.8.65	13 mU/ml	Ø
3'. Pat. R.M.	vom	2.8.65	15 mU/ml	Ø
4'. Pat. S.L.	vom	30.7.65	15 mU/ml	(+)
5'. Pat. F.R.	vom	30.7.65	15 mU/ml	Ø
6'. Pat. F.F.	vom	2.8.65	15 mU/ml	+
7'. Pat. H.S.	vom	29.7.65	17 mU/ml	Ø
8'. Pat. M.A.	vom	29.7.65	17 mU/ml	Ø
9'. Pat. A.M.	vom	30.7.65	17 mU/ml	Ø
10'. Pat. K.W.	vom	2.8.65	17 mU/ml	Ø

Zur Objektivierung der Ergebnisse wurde ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht, bei 100 Grad angetrocknet und im Durchlicht fotografiert.

Von den zehn Seren mit einer GOT-Aktivität zwischen 13 und 17 mU/ml zeigte nur eines eine einfache positive Agglutination mit GOT-AK-Latex; alle anderen lagen darunter. Dagegen fand sich bei zehn Seren mit einer GOT-Aktivität zwischen 25 und 30 mU/ml nie eine geringere als einfach positive Agglutination, in 7 der 10 Fälle sogar eine stärkere. Die Unterschiede waren auch nach Eintrocknung eines Tropfens auf dem Objektträger noch erkennbar (Abb. 5), wenngleich weniger abgestuft als bei der Betrachtung vor der Eintrocknung. Die geringfügige Überschneidung beider Gruppen (ein positiver Ausfall bei einem Patienten mit ca. 15 mU GOT/ml) ist möglicherweise damit zu erklären, daß Enzymaktivität und Enzymantigenität dissoziieren.

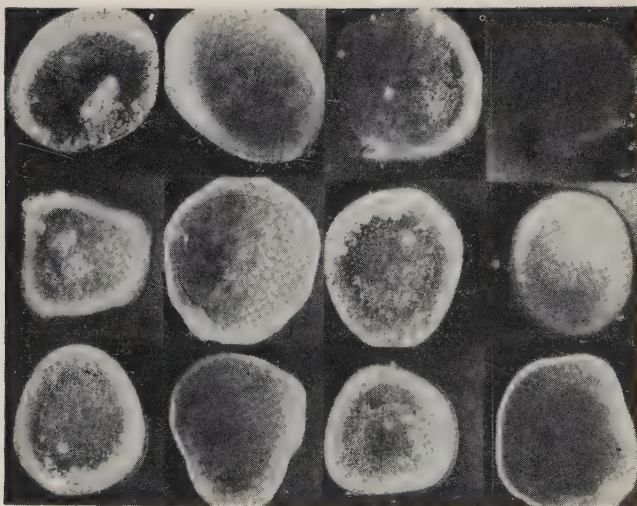


Abb. 5. Dargestellt sind die Ergebnisse der ersten sechs Ansätze des Versuchs X, fotografiert im Durchlicht nach Trocknung eines Tropfens bei 100 Grad auf dem Objektträger.

In den senkrechten Reihen 1 und 2 sind nebeneinander die Ansätze 1 bis 3 sowie 1' bis 3', in den senkrechten Reihen 3 und 4 die Ansätze 4 bis 6 sowie 4' bis 6' des Versuchs X abgebildet.

Eine Publikation der Versuchsergebnisse zu Abb. 5 ist im Druck (10).

3. Agglutinations-Inhibitionstest zum Enzymnachweis
Wenngleich in den Versuchen des vorigen Abschnittes eine gute Empfindlichkeit zum Nachweis des Enzyms erreicht schien, wurde zusätzlich die bei anderen Anwendungen als besonders empfindlich bekannte Inhibitionstechnik untersucht.

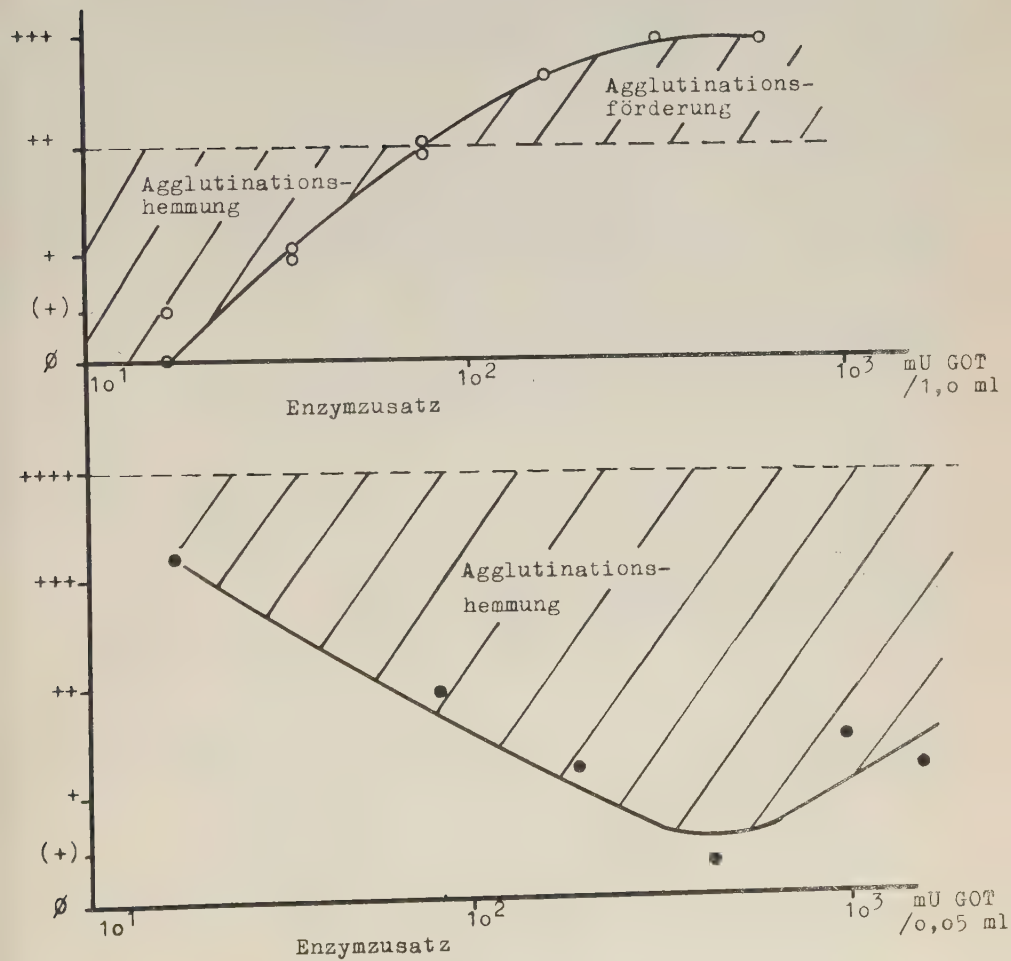


Abb. 6. Graphische Darstellung der Versuche XI (untere Teilabbildung) und XII (obere Teilabbildung). Die Punkte der Kurve •• sind Mittelwerte aus Vierfach-Bestimmungen.

Diese Modifikation der Latex-Methode (s. Methodik 5d.) beruht darauf, daß die Antikörper-Agglutination des enzymbeladenen Latex umso stärker gehemmt wird, mit je mehr Enzym der Antikörper vorinkubiert wurde, z.B. in Seren mit unbekanntem Enzymgehalt.

In diesen Versuchen diente als "positive" Kontrolle die Enzym-Latex-Agglutination durch den nicht mit Inhibitor vorinkubierten Antikörper (unterbrochene Linie in beiden Teilabbildungen der Abb. 6).

a. Unter den zu Abb. 6, untere Teilabbildung, beschriebenen Inkubationsbedingungen (s. Versuch XI) resultierte eine mit zunehmendem Enzymgehalt bis zu 500 mU/o,05 ml zunehmende Hemmung (ausgezogene Kurve), darüberhinaus (bei zwei- bis viermal höherer Enzymdosis) eine anscheinend wieder geringgradigere Hemmung.

Versuch XI

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von GOT, die eine Stunde lang mit dem Antikörper vorinkubiert wird. Danach Zugabe von GOT-Latex.

Ansatz:

1. 0,1 ml AK + 0,05 ml GOT 1:5	(1800 mU)	zu 0,5 ml GOT-Latex
2. 0,1 ml AK + 0,05 ml GOT 1:10	(900 mU)	↓
3. 0,1 ml AK + 0,05 ml GOT 1:20	(450 mU)	
4. 0,1 ml AK + 0,05 ml GOT 1:50	(180 mU)	
5. 0,1 ml AK + 0,05 ml GOT 1:100	(90 mU)	
6. 0,1 ml AK + 0,05 ml GOT 1:500	(18 mU)	
7. 0,1 ml AK		
8. 0,1 ml KG + 0,05 ml GOT 1:50	(180 mU)	

Vorinkubation 60 min. bei 37 Grad, Zugabe von GOT-Latex, Inkubation 90 min. bei 56 Grad, Kühlung über Nacht bei 6 - 8 Grad, Zentrifugation 10 min. bei 5000 Upm.

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6	7	8
+	++	{+}	+	+	+++	++++	Ø
++	++	{+}	+	+	+++	++++	{+}
					+++		
+	+	Ø	++	+++	-	++++	{+}
					++++		
+	+	Ø	+	+++	+++	++++	+

Mittelwerte:

1,25	1,5	0,25	1,25	2,0	3,25	4,0	0,5
------	-----	------	------	-----	------	-----	-----

In diesem Versuch, der in vier Ansätzen parallel lief, bildet das Röhrchen 7 die "positive" Kontrolle (entsprechend der unterbrochenen Linie der unteren Teilabbildung in Abb. 6).

Der Versuch XI zeigt die grundsätzliche Möglichkeit, mit Hilfe einer Inhibitionsmethode im Latextest das Enzym nachzuweisen.

b. Beim oberen Versuch der Abb. 6 wurden die Inkubationsbedingungen leicht abgeändert; hier erfolgte - bei einer niedrigeren Inkubationstemperatur - keine Inaktivierung evtl. vorhandenen Komplements. Es fand sich - bei gleichem Latex, gleichem Antikörper und gleicher GOT - gegenüber dem Versuch XI (Absatz 3a) eine "Linksverschiebung" des Maximums der Agglutinationshemmung von 450 auf < 20 mU Inhibitor-GOT im Ansatz. Bei Erhöhung der GOT auf > 100 mU kam es zu einer höheren Agglutination als im positiven Kontrollversuch (unterbrochene Linie der oberen Teilabbildung).

Versuch XII

Prinzip: Herstellung einer Verdünnungsreihe von GOT, die 30 min. bei Zimmertemperatur mit dem Antikörper vorinkubiert wird. Danach Inkubation dieses Komplexes mit GOT-Latex wiederum 30 min. bei Zimmertemperatur. Zentrifugation nur kurzzeitig bei niedriger Tourenzahl (Modifikation zu Methodik 5d).

Ansatz:

1. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:500	(720 mU)	zu 1,0 ml GOT-Latex
2. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:1000	(360 mU)	↓
3. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:2000	(180 mU)	
4. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:5000	(72 mU)	
5. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:10000	(36 mU)	
6. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:20000	(18 mU)	
7. 0,1 ml AK + 1,0 ml Glykokoll-NaCl-Puffer		
8. 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:10000	(36 mU)	zu 1,0 ml Ø-Latex

Vorinkubation 30 min. bei 20 Grad, Zugabe von GOT-Latex, bzw. Ø-Latex, Inkubation 30 min. bei 20 Grad, Zentrifugation 3 min. bei 2300 Upm. Danach Ablesen nach Trübung bzw. Klarheit des Überstandes (+++ + klar, Ø = vollkommen trübe).

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6	7	8
+++	+++	+++	++	+	∅	++	∅
+++	+++	++	++	+	∅	++	∅

Mittelwerte:

3,0	3,0	2,5	2,0	1,0	0,0	2,0	0,0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

In diesem Versuch bildet das Röhrchen 7 den "positiven" Kontrollversuch (entsprechend der unterbrochenen Linie der oberen Teilabbildung der Abb. 6).

Bei der in Versuch XII angewandten niedrigen g-Zahl bleibt der nicht agglutinierte Latex nach dem Zentrifugieren in Suspension; die Agglutinationsabstufung läßt sich unter diesen Bedingungen besser an der Gesamttrübung (Abb. 7) ablesen als am Sediment.

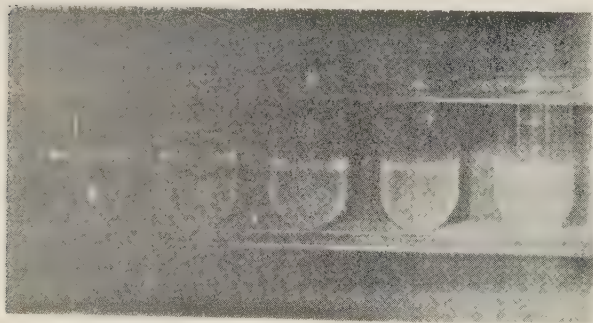


Abb. 7. Die abgestufte Trübung nach Zentrifugation der Röhrchen des Versuchs XIII.

Versuch XIII

Prinzip: s. Versuch XII (Wiederholung)

Ansatz:

- 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:500 (720 mU) zu 1,0 ml GOT-Latex
- 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:5000 (72 mU)
- 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:10000 (36 mU)
- 0,1 ml AK + 1,0 ml GOT 1:20000 (18 mU)
- 0,1 ml EG + 1,0 ml GOT 1:500 (720 mU)

Vorinkubation 30 min. bei 20 Grad, Zugabe von GOT-Latex,
Inkubation 30 min. bei 20 Grad, Zentrifugation 3 min.
bei 2300 Upm.

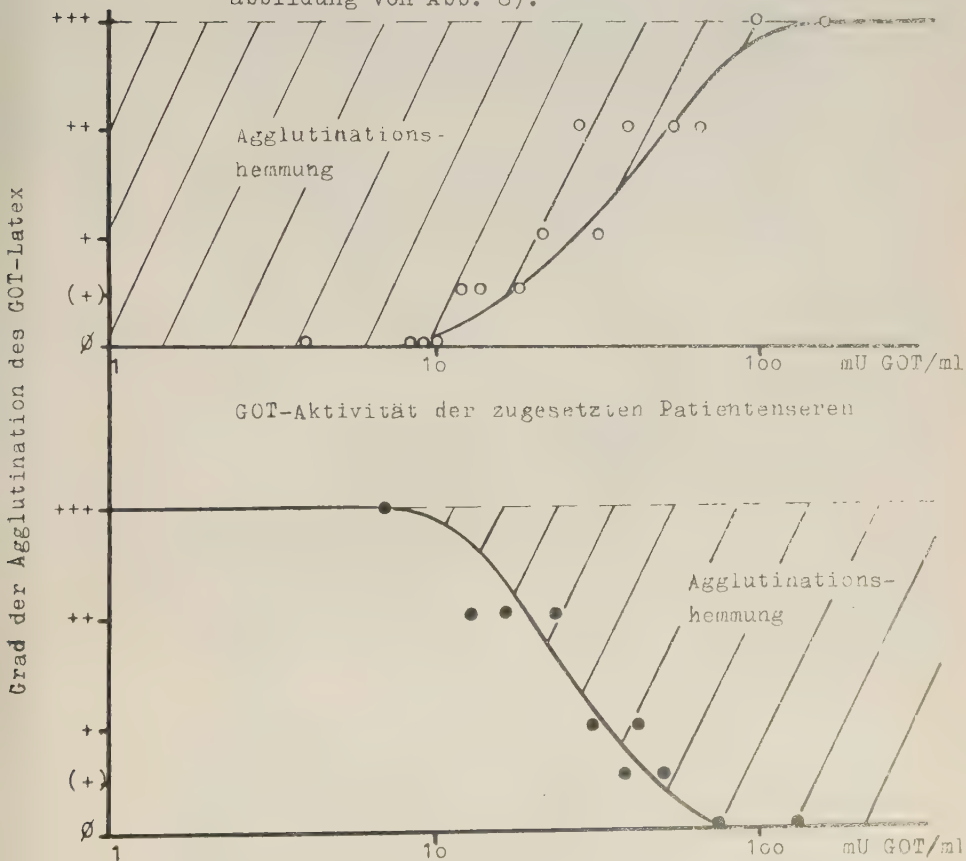
Bewertung wie in Versuch XII.

Ergebnis:

1	2	3	4	5
+++	++	+	(+)	Ø

Dieser Versuch wurde mehr zur Dokumentation (Abb. 7) durchgeführt. Aus diesem Grunde wurde auf Parallelansätze verzichtet.

c. Die Inkubationstechnik der Versuche XI bis XIII wurde in ähnlicher Weise bei Patientenseren unterschiedlicher GOT-Aktivität durchgeführt, ebenfalls in den beiden Modifikationen mit und ohne thermische Komplement-Inaktivierung (untere und obere Teilabbildung von Abb. 8).



GOT-Aktivität der zugesetzten Patientenseren
Abb. 8. Graphische Darstellung der Versuche XIV (obere Teilabbildung) und XV (untere Teilabbildung).

Komplementhaltiges Serum mit geringem GOT-Gehalt (oben) hemmt im Gegensatz zu dekomplementiertem Serum mit geringem GOT-Gehalt (unten) die GOT-Latex-Agglutination durch Antikörper vollständig (von +++ auf $\emptyset$). Diese Hemmung wird aber mit zunehmendem GOT-Gehalt des Serums zunehmend aufgehoben. Erst nach Komplemententfernung (untere Teilabbildung) führt ansteigender GOT-Gehalt des Serums zu der erwarteten gegenteiligen Wirkung, nämlich einer stärkeren Hemmung.

Versuch XIV

Prinzip: Antikörper und GOT-haltiges Serum werden 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert; dann folgt die Inkubation dieses Komplexes mit GOT-Latex wiederum 30 min. bei Zimmertemperatur.

Ansatz:

1.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (135 mU GOT/ml)	zu 1,0 ml GOT-Latex
2.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (105 mU GOT/ml)	
3.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (84 mU GOT/ml)	
4.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (72 mU GOT/ml)	
5.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (52 mU GOT/ml)	
6.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (42 mU GOT/ml)	
7.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (36 mU GOT/ml)	
8.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (27 mU GOT/ml)	
9.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (21 mU GOT/ml)	
10.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (15 mU GOT/ml)	
11.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (13 mU GOT/ml)	
12.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (10 mU GOT/ml)	
13.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (9 mU GOT/ml)	
14.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (8 mU GOT/ml)	
15.	0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (4 mU GOT/ml)	
16.	0,1 ml AK + 1,0 ml Glykokoll-NaCl-Puffer	

Vorinkubation 30 min. bei 20 Grad, Zugabe von GOT-Latex, Inkubation 30 min. bei 20 Grad, Zentrifugation 3 min. bei 2300 Upm.
Bewertung s. Versuch XII.

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6	7	8
+++	+++	++	++	++	+	++	+
9	10	11	12	13	14	15	16
(+)	(+)	(+)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	+++

Das Ergebnis zeigt eine Zunahme der Trübung bei fallendem GOT-gehalt des Serums. Das bedeutet, daß in den

Fällen, wo der Antikörper mit Serum-GOT abgesättigt war, der GOT-Latex allein sedimentierte; wo aber Antikörper noch frei war, sedimentierte der Komplex AK-GOT-Latex.

Versuch XV

Prinzip: Antikörper und GOT-haltiges Serum werden (zur Zerstörung des Komplementes) 90 min. bei 56 Grad inkubiert. Die Inkubation mit GOT-Latex geschieht 30 min. lang bei 20 Grad.

Ansatz:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (135 mU GOT/ml) | zu 1,0 ml
GOT-Latex |
| 2. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (72 mU GOT/ml) | ↓ |
| 3. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (50 mU GOT/ml) | |
| 4. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (42 mU GOT/ml) | |
| 5. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (38 mU GOT/ml) | |
| 6. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (30 mU GOT/ml) | |
| 7. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (26 mU GOT/ml) | |
| 8. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (17 mU GOT/ml) | |
| 9. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (13 mU GOT/ml) | |
| 10. 0,1 ml AK + 1,0 ml Serum (8 mU GOT/ml) | |
| 11.-20. wie 1.-10. nur statt AK KG. | |
| 21. 0,1 ml AK + 1,0 ml Glykokoll-NaCl-Puffer | zu 1,0 ml
GOT-Latex |

Vorinkubation 90 min. bei 56 Grad, Zugabe von GOT-Latex, Inkubation 30 min. bei 20 Grad, Zentrifugation 3 min. bei 2300 Upm.

Bewertung s. Versuch XII.

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
∅	∅	(+)	+	(+)	+	++	++	++	+++
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
21									
+++									

Das Ergebnis zeigt eine Abnahme der Trübung bei fallendem GOT-Gehalt des Serums. Dieser zum Versuch XIV gegensätzliche Befund bedeutet, daß nach Inaktivierung des Komplementes eine Hemmung des AK-GOT-Latex-Komplexes durch die Serum-GOT erfolgt, und zwar direkt proportional der Höhe der GOT-Aktivität im Serum.

6.	0,3	ml Kontrollglobulin + 0,5 ml GOT-Latex	
7.	0,3	ml AK-Latex	
8.	0,2	ml	
9.	0,1	ml	
10.	0,05	ml	
11.	0,01	ml	
12.	0,3	ml KG-Latex	

Inkubation 30 min. in Vertiefungen von Kunststoffplatten unter Schütteln bei 20 Grad. Bewertung in üblicher Weise nach dem Grad der Ausflockung.

Ergebnis:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Ø	+	++	+++	+++	+++	Ø
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Ø	+	++	+++	+++	+++	Ø
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Ø	+	++	+++	+++	+++	Ø
(+)	(+)	Ø	(+)	Ø	Ø	+	++	+++	+++	+++	Ø

Es wurden insgesamt vier Versuche angesetzt, davon jeweils zwei als Parallelversuche in einem zeitlichen Abstand von 1 1/2 Jahren.

Das Ergebnis zeigt die oben näher erklärte zunehmende Agglutination mit abnehmendem AK-Latex-Angebot. Die Versuchsanordnung bringt keine Empfindlichkeitssteigerung des Antigen- oder Antikörpernachweises.

D. Diskussion

Das Fehlen eines einfachen, genügend empfindlichen und spezifischen Tests zur Transaminasebestimmung gab Anlaß, die Kenntnis der Transaminasenimmunologie zur Ausarbeitung einer immunologischen Bestimmungsmethode zu benutzen. Von dem u.a. in der Rheumaserologie bewährten Latextest erwarteten wir eine je nach Testmodifikation und Aufwand mehr oder weniger quantitative Aussage, in der einfachsten Form nur die Unterscheidung von "normal" und "pathologisch".

Bei seiner Anwendung an Transaminasen, insbesondere der cytoplasmatischen GOT, haben wir die beiden bekannten Hauptmodifikationen des Verfahrens miteinander verglichen; an Seren unterschiedlicher GOT-Aktivität wurden untersucht:

- a. ihre unterschiedliche Agglutinationswirkung auf antikörperbeladenen Latex (Absatz 2) und
- b. ihre ebenfalls unterschiedliche Inhibitionswirkung auf die zwischen Antikörper und enzybeladenem Latex erfolgende Agglutination (Absatz 3).

Eine Voraussetzung für das letztgenannte, indirekte Verfahren hatten wir eingangs (Absatz 1) geklärt: die gegenüber denaturierenden Einflüssen empfindlichen Enzyme (GPT stärker empfindlich als GOT) behielten bei der Bindung an Latexpartikel Antigenität und Antigenspezifität bei.

Eine weitere Voraussetzung für die Anwendung des Latextests, u.z. in den beiden oben ausgeführten Hauptmodifikationen, war abzuklären. Es war zu untersuchen, wie weit Agglutinationshemmung durch "unspezifische" Serumfaktoren beeinflußt wurden. Dazu verglichen wir die Wirkung des gereinigten Enzyms mit der des in Seren mit unterschiedlichen Proteinspektren enthaltenen Enzyms. Bei der Agglutinationsmethode zeigte der Vergleich - trotz des relativ groben Ableseverfahrens - sehr ähnliche Ergebnisse (vgl. die Kurven in Abb. 3 oben und in

Abb. 4). Dort resultierte auch kein wesentlicher Unterschied, ob nun die Inkubation bei 56 Grad mit anschließendem Zentrifugieren oder bei Zimmertemperatur unter Schütteln aber ohne Zentrifugieren, erfolgte. Auch bei der Inhibitionsmethode war der Kurvencharakter (der Agglutinationsinhibition) beim gereinigten Enzym (Abb. 6) und beim Enzym in Serum (Abb. 8) ähnlich; jedoch fand sich hier eine Interferenz des Komplements oder eines anderen thermolabilen Faktors: es kam zu einer Umkehr der Kurvenrichtung, wenn die Temperatur der Vorinkubation oder der Inkubation 56 statt 20 Grad betrug (vgl. jeweils die untere mit der oberen Kurve in Abb. 5 und 7).

Der Unterschied in der Lage des Inhibitionsmaximums im hitzeinaktivierten Ansatz mit isolierter GOT (Abb. 6 unten) und mit Serum-GOT (Abb. 8 unten) kann mit der unterschiedlichen GOT-Latex: Antikörper-Relation erklärt werden.

Agglutinations- und Inhibitionsmethode reichten in ihrer Empfindlichkeit bis in den Grenzbereich des normalen Serum-GOT-Spiegels. Beide ermöglichen bei Standardisierung des Antikörpers (Verwendung eines Mischantisera) und Doppelbestimmung eine abgestufte Enzymbestimmung, z.B. in der Methodik der Abb. 4 (Kurve o—o) die Aussage, ob die GOT-Aktivität im Bereich von 20 mU (= keine Agglutination) oder ca. 30 - 50 mU (+ bis ++) oder bei 100 und mehr mU (+++) liegt.

Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit des Latextestes konnte durch eine Doppelbeladung nicht erzielt werden (Absatz 4). Dabei störte vielmehr der Überschuss an "freien" Latexpartikeln die exakte Beurteilung der Agglutination.

Zu einem Screeningtest, der lediglich der Differenzierung normal/pathologisch dient, empfiehlt sich wegen der bereits diskutierten Vorteile (keine Notwendigkeit zur Hitzeinaktivierung, nur einmalige Inkubation) die Agglutinationsmethode (s. Absatz 2c).

E. Zusammenfassung

1. Es wird eine Methode zum immunologischen Nachweis des Enzym-Antikörpers untersucht, bei der das Enzym (meist GOT) an Latex gehängt worden war. Die Ergebnisse dieser Versuchsanordnung zeigen, daß mit Hilfe des Latextestes der Antikörper in einer Menge von etwa 0,1 ml einer 3%igen Globulinlösung nachgewiesen werden kann.
2. Unter mehreren Methoden zum Nachweis der GOT erscheint eine am geeignetesten, bei der in kurzer Zeit (30 bis 60 min.) und bei unkompliziertem Verfahren (Schütteln in Glasschalen) ein Nachweis von GOT-Aktivitäten um etwa 25 mU/ml gelang und von Aktivitäten im Grenzbereich der Norm (ca. 15 mU/ml) unterschieden wurde. Durch diese Empfindlichkeit rückt der hier als Agglutinationsmethode durchgeführte Test in den diagnostisch interessanten Bereich.
3. Eine Inhibitionsmethode zum Enzymnachweis mit Hilfe des Latextests zeigt im Prinzip die gleiche Empfindlichkeit. Der Reaktionsablauf bei diesem Verfahren wird jedoch durch einen thermolabilen Faktor beeinflusst. Wegen der längeren Inkubationszeiten eignet es sich zur routinemäßigen Anwendung nicht so gut wie die Agglutinationsmethode.
4. Die primär an GOT-Lösungen gewonnenen Erkenntnisse des Enzymnachweises können in der Praxis, wie entsprechende Versuche zeigen, auf Seren mit unterschiedlicher GOT-Aktivität übertragen werden. Damit wird es möglich, in unkomplizierten Routineuntersuchungen das Enzym semiquantitativ nachzuweisen.

F. Literatur

1. GOLDIN, M.: The use of latex particles sensitized with human chorionic gonadotropin in a serologic test for pregnancy.
Am.J.Clin.Path. 38,3, 335-338 (1962).
2. HENRY, J.B. and W.A. LITTLE: Immunological test for pregnancy.
JAMA 182,3, 230 (1962).
3. HURIEZ, CL., F.DESMONS, P.AGACHE, J. BAELDEN et J.-P.DUQUENNE: La réaction au latex-histamine de Mikol, Renoux et Merklen en dermatologie d'après 1000 déterminations. Presse méd. 72, 909 (1964).
Dort weitere Literatur.
4. LANG, N.: Antikörper gegen Transaminasen. (Ein Beitrag zur Organantikörperforschung.) Int.Arch.Allergy 26, 345 (1965).
5. LANG, N. und B. HOEFFGEN: Kopräzipitation und Präzipitationshemmung durch nichtimmunologische Proteinassoziationen.
Proc. 11th Colloq. "Protides of the Biol.Fluids" Bruges 1963, p. 377. Amsterdam: Elsevier Publ.Co. 1964.
6. LANG, N. und S. MASSARRAT: Versuche zur immunologischen Enzymbestimmung mit Transaminaseantikörpern. Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 68, 275 (1962)
7. LANG, N. und S. MASSARRAT: Immunologie und Enzymkinetik der Transaminasen verschiedener Organe und Spezies.
Proc. 12th Colloq. "Protides of the Biol.Fluids" Bruges 1964, p. 246. Amsterdam: Elsevier Publ.Co. 1964.
8. LANG, N. und S. MASSARRAT: Immunologische Untersuchungen an Transaminasen. Verh.dtsch.Ges.Physiol. Chem., 15.Mosbacher Colloquium; Immunchemie. 1964. (Im Druck)
9. LANG, N. und S. MASSARRAT: Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase. II.Mitt. Untersuchungen zur Isoenzym-, Organ- und Speziespezifität. Klin.Wschr. 43, 597 (1965).
10. LANG, N. und A. WIETASCH: Ein Latextest zur Transaminasebestimmung im Serum. Naturwissenschaften (im Druck).
11. LAUBE, H.: Untersuchungen zur Bindung J-131-markierter Antikörper- und Nichtantikörperglobuline an menschliche Normalgewebe und Carcinome. Dissertation Marburg/Lahn (1959).

12. MASSARRAT, S. und N. LANG: Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase. I.Mitt. Untersuchungen zur Kinetik der Hemmwirkung von Transaminaseantikörpern. Klin.Wschr. 43, 510 (1965).
13. MASSARRAT, S. und N. LANG: Wie (12). III.Mitt. Immunhemmung der Transaminasen im Serum von Leberkranken und von Patienten nach Herzinfarkt. Klin. Wschr. 43, 602 (1965)
14. MILGROM, F. and R. GOLDSTEIN: Agglutination of sensitized red blood cells by latex particles. Vox Sang. 7, 1, 86 ff (1962).
15. PHILP: J.Clin.Path. 15, 148 (1962)
16. RHEINS, M.S., F.W. MCCOY, R.G. BURRELL and E.V. BUEHLER: A modification of the latex fixation test for the study of rheumatoid arthritis. J.Lab.Clin. Med. 50, 113-118 (1957).
17. SINGER, J.M. and C.M. PLOTZ: The latex fixation test I. Application to the serologic diagnosis of the rheumatoid arthritis. Am.J.Med. 21, 888-892 (1956)
18. WORMALL, A., G.E. FRANCIS and W. MULLIGAN: Labelling of proteins with J-131. Nature 167, 748 (1951).

Lebenslauf:

Ich wurde am 18. August 1940 als Sohn des damaligen Bankoberinspektors Wilhelm Wietasch und seiner Ehefrau Dora, geb. Krause in Berlin geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Eichwalde bei Berlin über 7 Jahre übersiedelte unsere Familie nach Dortmund, wo mein Vater jetzt als Prokurist der Dortmunder Union Brauerei tätig ist. Von Ostern 1953 an besuchte ich das Aufbaugymnasium der Stadt Dortmund, wo ich am 19. März 1959 das Zeugnis der Reife erhielt.

Ich begann mein Studium im SS 1959 an der Marburger Philipps-Universität, wo ich die naturwissenschaftliche und die ärztliche Vorprüfung ablegte. Nach drei klinischen Semestern in Marburg ging ich für ein Semester nach Freiburg und kehrte dann für den Rest des Studiums nach Marburg zurück, wo ich am 25. Feb. 1965 die ärztliche Prüfung ablegte.

Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich bisher vier Monate an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg und anschließend fünf Monate auf der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Wittingen beschäftigt.

Nach meiner Eheschließung im Dezember 1965 arbeite ich jetzt als Medizinalassistent auf dem Sanatorium Sonnenblick in Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Amon, Beckmann, Braun-Falco, Bock, Buchholz, Bücher, Delbrück, Dimroth, du Mesnil de Rochemont, Eggstein, Exner, Gedigk, Golenhofen, Groß, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kessler, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mann, Martini, Marx, Mattes, Müller, Niessing, Nieth, Oksche, Peters, Petry, Sauer, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Stein, Streicher, Vogt, Walcher, Waller, Wendt, Würterle.

in Freiburg:

Doden, Giertz, Göpfert, Hauf, Künzer, Oehlert, Unger, Wegener, Weyrich, Zöllner.



Gedruckt bei
HERMANN KORBACHER, MARBURG/L
Ruf 3088